Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 17, No.1, 2025, p. 63-75

Effects of Commercial Probiotics on Sperm Traits, Intestinal Morphology, Gut Microflora, and Antioxidant Status in 65-Week-Old Ross 308 Broiler Breeder Roosters

Arash Hadavi[1], Farogh kargar[2], Najeebullah Fayaz[3*], Ali tayebipour[4], Muhammad amin namaz zadagan[5]

1,2,4 and 5- Ph.D. Student and Ph.D. Graduated, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
Assistant Professor, Department of Animal Science, Laghman University Faculty of Agriculture, Afghanistan
*Corresponding Author's Email: nfayaz343@lu.edu.af

Received: 04-08-2024 Revised: 26-11-2024 Accepted: 30-11-2024 Available Online: 30-11-2024	**How to cite this article:** Hadavi, A., Kargar, F., Fayaz, N., Tayebipour, A., Namaz Zadagan, M., & (2024). Effects of commercial probiotics on sperm traits, intestinal morphology, gut microflora, and antioxidant status in 65-week-old ross 308 broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *17*(1), 63-75. (in Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.89135.1211

Introduction: Probiotics are live microbial feed supplements that exert beneficial effects on host animals by enhancing the balance of intestinal microbes (Fesseha, 2019). In poultry production, probiotics are increasingly viewed as alternatives to oral antibiotics due to growing concerns regarding antimicrobial resistance (Ogbuewu *et al*., 2022). Bacillus probiotics, in particular, have shown significant promise thanks to their spore-forming capabilities and resistance to feed processing (Ogbuewu *et al*., 2022). The stability of Bacillus spores in various stressful conditions, along with their ability to produce a range of enzymes such as protease, amylase, and lipase, makes them suitable food additives (Lei *et al*., 2013). Research indicates that probiotic supplementation can enhance growth performance, feed conversion efficiency, and antioxidant status in broilers (Jadhav *et al*., 2015; Ogbuewu *et al*., 2022). Additionally, probiotics contribute to improved intestinal health by promoting beneficial microflora and enhancing intestinal morphology (Ogbuewu *et al*., 2022). Likewise, probiotics can boost various performance and health parameters in poultry, including body weight gain, feed conversion ratio, and overall intestinal health (Alhefny *et al*., 2022; Aziz *et al*., 2022; Hassan *et al*.,2023; Prentza *et al*., 2022; Smolovskaya *et al*., 2023).The administration of synbiotics has been associated with positive effects on gut health, survival rates, and the composition of gut microbiota in broiler hens, suggesting potential benefits for reproductive performance and overall health in later life (Prentza *et al*., 2022). Furthermore, the use of probiotics does not lead to antibiotic resistance in intestinal bacteria, nor does it cause the accumulation of antibiotics in bird tissues (Angelakis, 2017; Blajman *et al*., 2015). Common probiotic strains utilized in poultry include species of Lactobacillus, Enterococcus, and Bacillus (Fesseha, 2019). Although probiotics demonstrate potential as growth promoters, their effects can vary depending on the specific strains used and their dosages (Ahmad,2006). The characteristics

http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.89135.1211

of an effective probiotic include the following:1. It is non-pathogenic.2. It exerts a positive effect on the host animal.3. It can survive in the intestinal environment.4. It remains viable under storage conditions.5. It has a high shelf life during processing.6. It competes effectively with harmful bacteria (Smirnov *et al*., 2005).

Materials and Methods: This experiment aimed to investigate the effects of commercial probiotics on sperm traits, intestinal morphology, gut microflora, and antioxidant status in 65-week-old Ross 308 male broiler breeders. A completely randomized design was used with 5 treatments, 10 replications, and one male per unit, totaling 50 males. Sperm characteristics were assessed by collecting samples using the abdominal rub method every ten days. The eosin and nigrosine staining method determined the percentage of live and dead sperm. Antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity were also measured. At the experiment's conclusion, all roosters were slaughtered to evaluate intestinal morphology and quantify E. coli and Lactobacillus populations.

Results and Discussion: The effects of varying levels of commercial probiotics on sperm parameters—such as volume, motility, live sperm percentage, sperm count, and abnormal sperm percentage—in 65-week-old Ross 308 broiler breeders are detailed in Table 3. The study found that the experimental treatments did not significantly affect sperm volume, motility, or live sperm percentage. However, during the first and second months, sperm counts in groups receiving 100, 150, and 200 mg/kg of probiotics were significantly higher than in the control group ($P<0.05$). Bacillus supplementation notably increased live sperm counts (Mazanko *et al*., 2018). Additionally, the percentage of abnormal sperm was significantly lower ($P<0.01$) in the 100, 150, and 200 mg/kg probiotic groups compared to controls. Consistent with our findings, vitamin E has been reported to enhance semen volume, sperm motility, and egg fertility, while vitamin C reduces dead sperm percentages (Khan *et al*., 2012; Khan *et al*., 2013). In the first month, supplementation with 150 and 200 mg/kg of probiotics, and in the second month with 50, 150, and 200 mg/kg, significantly increased total antioxidant capacity ($P<0.05$). Probiotics also significantly increased villi length, with the highest jejunum villi length observed in the 150 mg/kg group (1231 micrometers) compared to the control (1156 micrometers). The villus-to-crypt depth ratio was highest in the 150 mg/kg group, showing significant improvement over controls. Probiotic addition significantly increased Lactobacillus numbers in the jejunum and ileum ($P<0.05$), while E. coli counts in the jejunum were significantly reduced compared to the control group.

Conclusion: The study demonstrated that probiotics in poultry nutrition enhance the immune system by settling in the digestive tract, preventing pathogens from adhering to intestinal villi, creating acidic conditions, and producing bactericides. This, in turn, improves nutrient digestion. Additionally, roosters fed with 100, 150, and 200 mg/kg probiotics showed a significantly higher number of live sperm compared to the control group. Overall, based on sperm characteristics, intestinal morphology, gut microflora, and antioxidant status, 100 mg/kg of probiotics is recommended as the optimal dosage.

Keywords*: Antioxidant, Broiler Breeder Roosters, Commercial probiotic, Gut Microflora, Intestinal morphology*

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴، ص. ۷۵-۶۳

اثرات پروبیوتیک تجاری بر صفات اسپرم، ریخت‌شناسی روده، جمعیت میکروبی روده و وضعیت آنتی‌اکسیدانی خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی

آرش هادوی[1]، فاروق کارگر[2]، نجیب اله فیاض[3*]، علی طیبی پور[2]، محمد امین نمازی زادگان[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر پروبیوتیک تجاری بر صفات اسپرم، ریخت‌شناسی روده، جمعیت میکروبی روده و وضعیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از تعداد ۵۰ قطعه خروس مادر گوشتی سویه راس (۳۰۸) در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار، ۱۰ تکرار و یک قطعه پرنده در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک در کیلوگرم خوراک بود. نتایج آزمایش نشان داد که افزودن ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک به جیره باعث افزایش تعداد اسپرم‌های زنده و کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های غیرطبیعی شد ($P<0/05$). خروس‌های دریافت‌کننده ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتری از سایر گروه‌ها داشتند ($P<0/05$). بیشترین طول پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت در ژژنوم در گروه دریافت‌کننده ۱۵۰ و در ایلئوم در گروه دریافت‌کننده ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک بود که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند ($P<0/05$). تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* موجود در ژژنوم و ایلئوم در گروه‌های دریافت‌کننده ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود و تعداد باکتری *ای‌کلای* موجود در ژژنوم کمتری داشتند. براساس نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، استفاده از پروبیوتیک در تغذیه خروس‌های مادر اثرات مثبتی داشته است و مصرف ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پروبیوتیک تجاری، جمعیت میکروبی روده، خروس مادر گوشتی، ریخت‌شناسی روده

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های مفید زنده‌ای هستند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثر مفیدی بر حیوانات میزبان دارند (Fesseha, 2019). در پرورش طیور، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی، به‌دلیل نگرانی‌های مربوط به مقاومت ضد میکروبی، مورد توجه قرار گرفته است (Ogbuewu *et al*., 2022). خصوصیات و ویژگی‌های یک پروبیوتیک مناسب شامل موارد زیر است: ۱- عدم بیماری‌زایی ۲- تأثیر مثبت بر حیوان میزبان ۳- قابلیت زنده ماندن در محیط روده ۴- زنده ماندن در شرایط ذخیره‌سازی ۵- ماندگاری بالا در شرایط فرآوری ۶- قابلیت حذف رقابتی با باکتری‌های مضر را داشته باشد (Smirnov *et al*., 2005). سویه های رایج پروبیوتیک مورد استفاده در طیور شامل گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، *انتروکوکوس* و *باسیلوس* است (Fesseha, 2019). درحالی‌که پروبیوتیک‌ها توانایی خود را به‌عنوان تقویت‌کننده رشد نشان می‌دهند، اثرات آن‌ها براساس دوز و نوع سویه‌های استفاده‌شده متفاوت است (Ahmad, 2006). پروبیوتیک‌ها به‌دلیل قابلیت اسپورسازی و توانایی تحمل شرایط فرآوری خوراک، امیدبخش هستند (Ogbuewu *et al*., 2022). همچنین به‌دلیل پایداری اسپورهای آن‌ها در حضور تنش‌های متعدد و توانایی تولید انواع آنزیم‌ها مانند پروتئاز، آمیلاز و لیپاز، افزودنی‌های خوراکی مناسبی هستند (Lei *et al*., 2013). مطالعات نشان داده‌اند که مکمل‌های

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته دکتری و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لغمان، افغانستان
(*- نویسنده مسئول: Email: nfayaz343@gmail.com)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.89135.1211

پروبیوتیک می‌توانند اثر مثبتی بر عملکرد رشد، ایمنی و وضعیت آنتی اکسیدانی جوجه‌های گوشتی داشته باشند (Jadhav *et al*., 2015). در مطالعه‌ای، اثر دو پروبیوتیک تجاری چند سویه (Protexin® و Bio-Poul®) بر جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که استفاده از پروبیوتیک باعث بهبود ریخت‌شناسی روده، کاهش اکسیداسیون لیپید، تعدیل جمعیت میکروبی ایلئوم به‌نفع حیوان، افزایش ارتفاع پرزها و تعداد سلول‌های مخاطی در ژژنوم و ایلئوم، کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید، افزایش جمعیت *لاکتوباسیلوس* و کاهش گونه‌های *کلستریدیوم* شد (Kazemi *et al*., 2019). علاوه‌براین، پروبیوتیک‌ها می‌توانند عملکرد (افزایش وزن بدن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک) و سلامت روده را بهبود دهند (Aziz and Al-Hawezy, 2022; Alhefny *et al*., 2022; Hassan *et al*., 2023; Prentza *et al*., 2022; Smolovskaya *et al*., 2023). در خروس‌های مادر گوشتی بهبود پتانسیل تولیدمثلی بسیار مهم است (Fouad *et al*., 2020). با افزایش سن، خروس‌ها با چالش‌های فیزیولوژیکی از جمله کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تغییرات در ترکیب جمعیت میکروبی روده مواجه می‌شوند که می‌تواند بر کیفیت اسپرم و پتانسیل تولیدمثل تأثیر منفی بگذارد (Musa *et al*., 2021). افزودن پروبیوتیک در جیره غذایی، پتانسیل مقابله با این اثرات منفی مرتبط با افزایش سن را با بهبود جمعیت میکروبی روده، بهبود ساختار پرزهای روده و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده است (Mountzouris *et al*., 2007). در برخی از مطالعات، اثرات پروبیوتیک‌ها بر خروس‌های مادر گوشتی مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۸ گزارش شد که استفاده از سویه *Bacillus amyloliquefaciens* باعث بهبود ریخت‌شناسی روده، جمعیت میکروبی روده، فعالیت اکسیداتیو و کیفیت اسپرم در خروس‌های مادر گوشتی شد (Inatomi and Otomaru, 2018). در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی، ترکیب پروبیوتیک از گونه‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس*، اثر مثبتی بر عملکرد روده داشت (Song *et al*., 2014). پروبیوتیک‌ها به‌دلیل نقشی که در کاهش استرس اکسیداتیو دارند، یکی از عوامل اصلی مؤثر بر بهبود صفات مختلف اسپرم در حیوانات مسن هستند (Krysiak *et al*., 2021). علاوه‌براین، پروبیوتیک‌ها با تقویت جمعیت میکروبی مفید و افزایش جذب مواد مغذی از طریق بهبود ریخت‌شناسی روده، که در مجموع سلامت کلی و قابلیت تولیدمثل خروس‌های‌مادر را ارتقا می‌دهند، از سلامت روده حمایت می‌کنند (Poorghasemi *et al*., 2018). گزارش شده است که استفاده از سین‌بیوتیک‌ها اثرات مثبتی بر سلامت روده، بقاء و ترکیب باکتری‌های مفید روده در خروس‌مادر گوشتی دارند که نشان‌دهنده مزایای بالقوه برای عملکرد تولیدمثلی و سلامت کلی در سنین بالا است (Prentza *et al*., 2022).

همچنین، استفاده از پروبیوتیک‌ها برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های روده و تجمع آنتی‌بیوتیک‌ها در بافت‌های پرنده نمی‌شود (Angelakis, 2017; Blajman *et al*., 2015). با توجه به مطالب فوق‌الذکر، این آزمایش به‌منظور بررسی اثرات پروبیوتیک تجاری بر صفات اسپرم، ریخت‌شناسی روده، جمعیت میکروبی روده و وضعیت آنتی‌اکسیدانی خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه پروبیوتیک

پروبیوتیک مورد استفاده از شرکت چیتیکا با برند تجاری پاورپرو چیتیکا تهیه گردید که دارای هشت سویه باکتری (لاکتوباسیلوس رامنوسوس، باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیچنیفورمیس، انتروکوکوس فاسیوم، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدیفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم) با 10^{12} کلنی باکتری در هرگرم بود. به‌منظور افزودن پروبیوتیک به جیره‌ها، ابتدا مقدار مورد نیاز با مقدار کمی خوراک مخلوط گردید و سپس با کل جیره مخلوط گردید.

پرندگان، جایگاه و شرایط پرورش

در این آزمایش ۵۰ قطعه خروس مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸، در سن ۶۵ هفتگی انتخاب و به‌طور تصادفی بین قفس انفرادی که دارای ۳۰ سانتی متر طول، ۴۰ سانتی متر عمق و ۴۵ سانتی متر ارتفاع و به آب‌خوری پستانکی خودکار، دان‌خوری ناودانی دستی و سینی کشویی گالوانیزه مجهز بود، توزیع شدند. خروس‌ها به‌مدت دو هفته جهت عادت‌پذیری با جیره آزمایشی تغذیه شدند. دمای سالن در محدوده ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید، همچنین برنامه نوری ۱۵ ساعت روشنایی و نه ساعت تاریکی در شبانه روز بود.

تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک در کیلوگرم خوراک) و ۱۰ تکرار و یک قطعه خروس در هر تکرار انجام شد. جیره پایه براساس جدول استاندارد احتیاجات خروس‌های مادر گوشتی توصیه‌شده توسط راهنما سویه راس ۳۰۸ و انالیز خوراک به‌کمک نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تنظیم شد (جدول ۱).

جدول ۱- اجزاء تشکیل‌دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره پایه (٪)

Table 1- The ingredient and nutrient composition of basal diet (%)

اقلام خوراکی Ingredients	درصد Percentage	مواد مغذی Nutrient	
ذرت Corn	58.40	انرژی قابل سوخت‌وساز (کیلوگرم/ کیلوکالری) Metabolizable Energy (kcal/kg)	2731
کنجاله سویا (۴۴ درصد پروتئین) Soybean meal (44% CP)	30.00	پروتئین خام (درصد) Crude Protein (%)	15.80
روغن گیاهی Vegetable oil	1.20	کلسیم (درصد) Calcium (%)	4.40
کربنات کلسیم Calcium carbonate	7.00	فسفر قابل‌دسترس (درصد) Available Phosphorus (%)	0.52
دی کلسیم فسفات Di-calcium phosphate	2.00	لیزین قابل‌هضم (درصد) Digestible Lysine (%)	0.94
نمک طعام Common salt	0.27	متیونین+ سیستین قابل‌هضم (درصد) Digestible Methionine. + Cystine. (%)	0.70
دی–ال میتیونین DL-methionine	0.20	تریپتوفان قابل هضم (درصد) Digestible Tryptophan	0.19
دی–ال لیزین L–lysine	0.12	ترئونین قابل‌هضم (درصد) Digestible Threonine (%)	0.71
مکمل ویتامینه[۱] [1]Vitamin- premix	0.25	متیونین قابل‌هضم (درصد) Digestible Methionine (%)	0.45
مکمل معدنی[۲] [2]Mineral- premix	0.25		

[۱] هرکیلوگرم مکمل ویتامینه شامل ۱۱۰۲۵ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۵۲۸ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۳۳ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۰/۹۱ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۰/۱۸ گرم ویتامین B_1، ۰/۸۲۵ گرم ویتامین B_2، یک گرم ویتامین B_3، سه گرم ویتامین B_5، ۰/۳ گرم ویتامین B_6، ۰/۱۲۵ گرم ویتامین B_9، ۰/۱۵ گرم ویتامین B_{12} و ۵۰ گرم کولین کلراید است.

[۲] هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل ۵۰ گرم آهن، ۱۱ گرم روی، ۱۱۰ میلیگرم منگنز، شش گرم مس، یک گرم ید و ۰/۲ گرم سلنیوم است.

[1] Vitamin permix supplied the following, per kilogram of diet: vitamin A, 11025 IU; vitamin D_3, 3528 IU; vitamin E, 33 mg; vitamin K_3, 0.91 mg; Vitamin B_1, 0.18 g; Vitamin B_2, 0.825 g; Vitamin B_3, 1.00 g; Vitamin B_5, 3.00 g; Vitamin B_6, 0.30 g; Vitamin B_9, 0.125 g; Vitamin B_{12}, 0.15 g; choline chloride, 50 g;

[2] Mineral permix supplied the following per kilogram of diet: Fe (Fe-sulfate), 50 g; Zn (Zn-sulfate), 11 g; Mn (Mn-sulfate), 110 mg; Cu (Cu-sulfate), 6 g; I (calcum iodate), 1 g; Se (sodum selenite), 0.2 g.

ارزیابی فراسنجه تحرک اسپرم

به‌منظور بررسی صفات اسپرم و تأثیر تیمارهای پروبیوتیک بر آن هر ۱۰ روز یک بار (شش بار در کل دوره) از همه خروس‌ها به‌روش مالش شکمی اسپرم‌گیری شد (Akhlaghi *et al.*, 2014). به‌منظور رقیق‌سازی اسپرم برداشت شده از بلستویل تعدیل‌یافته با اسیدیته ۷/۴ و اسمولاریته ۳۱۰ mosm/kg استفاده شد (Amini *et al.*, 2015). همچنین برای ارزیابی در کل دوره از لوله‌های اسپرم‌گیری مدرج که دقت بالایی در اندازه‌گیری حجم اسپرم دارند، استفاده شد (Zamiri *et al.*, 2010). پس از اسپرم‌گیری بلافاصله نمونه‌ها به داخل آب با دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد منتقل و دو قطره سدیم سیترات ۲/۵ درصد به آن اضافه شد و سپس پنج میکرولیتر از آن روی لام ریخته شد و به‌آرامی روی آن پخش گردید و در ادامه با استفاده از میکروسکوپ نوری (میکروسکوپ سه چشمی بیولوژی مدل B-383-PL شرکت اپتیکا کشور ایتالیا) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، تحرک اسپرم در مقیاس صفر تا پنج (براساس جدول ۲) تعیین گردید (Assersohn *et al.*, 2021).

ارزیابی فراسنجه زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده از روش رنگ‌آمیزی با ائوزین و نیگروزین استفاده شد. بعد از اضافه کردن نمونه اسپرم روی لام، رنگ‌های ائوزین و نیکروزین به نسبت سه برابر حجم اسپرم به آن اضافه شد و بعد از ۳۰ ثانیه با هم مخلوط و روی لام پخش گردید و سپس با قرار دادن لام روی صفحه گرمایی اسپرم‌ها تثبیت شدند و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ توسط میکروسکوپ (میکروسکوپ سه چشمی بیولوژی مدل B-383-PL شرکت اپتیکا کشور ایتالیا) بررسی گردید (اسپرم‌های مرده رنگ را جذب و زنده مانع ورود رنگ به غشاء خود می‌شوند) (Andraszek *et al.*, 2018).

جدول ۲- مقیاس تحرک اسپرم

Table 2- Sperm motility scale

مقیاس Scale	درصد اسپرم‌های محرک The percentage of stimulating sperm	ارزیابی حرکت Movement assessment
0	صفر Zero	فاقد حرکت No movement
1	کمتر از ۲۰ درصد حرکت پیش رونده دارند Less than 20% have progressive movement	حرکت پیش رونده خیلی ضعیف Very weak forward movement
2	۲۰ تا ۴۰ درصد حرکت پیش رونده دارند 20 to 40% have progressive movement	حرکت پیش رونده ضعیف و کند Weak and slow progressive movement
3	۴۰ تا ۷۰ درصد حرکت پیش رونده دارند 40 to 70% have progressive movement	حرکت پیش رونده متوسط و عمدتا یک سویه Moderate progressive movement and mostly unidirectional
4	۷۰ تا ۹۰ درصد حرکت پیش رونده دارند 70 to 90% have progressive movement	حرکت پیش رونده خوب و یک سویه Good forward and unidirectional movement
5	بیش از ۹۰ درصد حرکت پیش رونده دارند More than 90% have progressive movement	حرکت پیش رونده سریع و یک سویه Fast and unidirectional forward movement

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم

جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از سانتریفیوژ یونیورسال هشتشاخه ساخت ایران به‌مدت ۱۵ دقیقه (۱۵۰۰×g) سانتریفیوژ گردید و پلاسما جدا شده به فریزر با دمای منفی ۲۰ منتقل گردید. از روش توانایی احیاکنندگی آهن‌فریک توسط قدرت آنتی‌اکسیدانی برای اندازه‌گیری ظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی کل و میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز از طریق روش نشانگر مقدار NADPH مصرف‌شده در مایع اسپرم با استفاده از کیت‌های تجاری نوند (Naxifer™-Total Antioxidant Capacity Assay Kit-TAC) و مطابق دستورالعمل آن‌ها با کمک دستگاه الایزا ریدر (مدل MR4 ساخت کشور آلمان) اندازه‌گیری شد (Shakouri *et al*., 2021).

ارزیابی ریخت‌شناسی روده

در روز آخر آزمایش به‌منظور اندازه‌گیری ریخت‌شناسی روده و تعداد باکتری‌های *ای-کلای* و *لاکتوباسیلوس* موجود در روده، کل خروس‌ها با استفاده از روش ذبح گردنی کشتار شدند. بعد از کشتار و بیرون آوردن امعاء و احشاء، روده جدا شده و از ژژنوم و ایلئوم نمونه برداری شد و با استفاده از سرم فیزیولوژیک شستشو گردید و سپس در داخل فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید و به آزمایشگاه جهت اندازه‌گیری طول پرز، و عمق کریپت منتقل و با استفاده از دوربین عکس‌برداری اندازه‌گیری شد و نسبت طول پرز به عمق کریپت نیز با استفاده از تقسیم طول پرز به عمق کریپت به‌دست آمد (Touchette *et al*., 2002). برای شمارش باکتری‌های (*ای‌کلای* و *لاکتوباسیلوس*) موجود در ژژنوم و ایلئوم، از محتویات آن‌ها یک گرم بعد از کشتار برداشته شد و درون لوله‌های آزمایش منتقل گردید و با استفاده از آب مقطر دیونیزه رقیق‌سازی انجام گرفت و به‌منظور شمارش باکتری *ای‌کلای* از محیط کشت مکانیکی و برای شمارش *لاکتوباسیل‌ها* از محیط کشت MRS Broth استفاده شد. محتویات رقیق‌شده روده پس از تزریق به محیط کشت به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور (کلاس B ساده ساخت ایران) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس تعداد کلنی‌های رشدیافته به‌صورت چشمی شمارش گردید. شمارش میکروبی ژژنوم و ایلئوم به‌عنوان واحدهای کلنی تشکیل‌دهنده بر پایه لگاریتم ۱۰ در هر گرم محتویات ژژنوم و ایلئوم گزارش شد (Lei *et al*., 2015). همچنین برای اندازه‌گیری pH روده کوچک، نمونه‌های ۲/۵ گرم از دو طرف دیورتیکول زائده میکل (Meckel's diverticulum) جمع‌آوری و به‌روش Jeacocke اندازه گیری شد (Jeacocke, 1977).

آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده از آزمایش قبل از تجزیه آماری مورد تست نرمالیته قرار گرفت. و سپس در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزارSAS ویرایش ۹/۳ (SAS, 2003) روش مدل عمومی خطی (GLM) تجزیه و تحلیل شدند. میانگین‌های مربوط با آزمون چند دامنه‌ای توکی در سطح احتمال پنج درصد (P< ۰/۰۵) مقایسه شدند.

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف پروبیوتیک تجاری روی برخی از پارامترهای اسپرم (حجم اسپرم، تحرک اسپرم، درصد اسپرم زنده، تعداد اسپرم و درصد اسپرم غیرطبیعی) در خروس‌های مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج نشان داد که استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک اثر معنی‌داری بر حجم اسپرم، تحرک اسپرم، درصد اسپرم زنده نسبت به گروه شاهد نداشت

(P>۰/۰۵). برخلاف نتایج این آزمایش گزارش شده است که *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس*، سویه‌های رایج پروبیوتیک، به‌طور قابل توجهی تحرک اسپرم را در شرایط آزمایشگاهی کاهش دادند (Haines *et al.*, 2013). در ماه اول و دوم آزمایش، تعداد اسپرم‌های گروه‌های دریافت‌کننده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). مشابه با نتایج این آزمایش، گزارش شده است که افزودن *باسیلوس* در جیره خروس‌های مادر باعث افزایش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های زنده شد (Mazanko *et al.*, 2018). همچنین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در گروه‌های دریافت‌کننده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) کمتر از گروه شاهد بود. مطابق با نتایج این آزمایش گزارش شده است که مکمل ویتامین E باعث افزایش حجم مایع منی، تحرک اسپرم و باروری تخمک شد، درحالی‌که ویتامین C، درصد اسپرم مرده را کاهش داد (Khan *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2013). همچنین استفاده از مکمل گوانیدینواستیک اسید (GAA)، به‌میزان ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش غلظت مایع منی، تعداد کل اسپرم و حرکت رو به جلوی اسپرم و در نهایت افزایش نرخ باروری در مرغ‌های مادر شد (Tapeh *et al.*, 2017).

جدول ۳– اثر سطوح مختلف پروبیوتیک تجاری بر برخی از پارامترهای اسپرم در خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی

Table 3- The effect of different levels of commercial probiotics on some sperm parameters in Ross 308 broiler breeder rooster at the age of 65 weeks

متغیر Item	ماه Month	تیمارهای آزمایشی * Experimental treatments* شاهد Control	50	100	150	200	خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی‌داری P value
حجم اسپرم (میلی‌لیتر) Sperm volume (ml)	ماه اول First month	0.49	0.50	0.51	0.51	0.51	0.010	0.3051
	ماه دوم Second month	0.50	0.52	0.52	0.50	0.51	0.009	0.6057
تحرک اسپرم (سطح ۵-۱) Sperm motility (score 1-5)	ماه اول First month	3.60	3.8	4.0	3.9	4.1	0.257	0.6937
	ماه دوم Second month	3.70	0.4	4.4	4.1	4.1	0.259	0.4520
درصد اسپرم زنده Percentage of live sperm	ماه اول First month	90.4	91.4	91.9	92.5	92.7	0.604	0.0687
	ماه دوم Second month	90.5	91.8	92.5	92.0	92.3	0.691	0.2870
تعداد اسپرم Sperm count	ماه اول First month	22.67[b]	23.27[ab]	23.81[ab]	24.02[a]	24.25[a]	0.337	0.0349
	ماه دوم Second Month	22.23[c]	22.98[bc]	23.72[ab]	23.90[ab]	24.66[a]	0.418	0.0023
اسپرم غیرطبیعی (٪) Abnormal sperm (%)	ماه اول First month	9.61[a]	8.45[ab]	7.71[b]	7.23[b]	7.02[b]	0.228	0.0001
	ماه دوم Second month	9.68[a]	9.16[a]	7.73[b]	7.21[b]	7.29[b]	0.220	0.0001

* تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک در کیلوگرم خوراک

a-d میانگین‌ها با حروف متفاوت در یک ستون دارای اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد هستند.

* Experimental treatments include control treatment, 50, 100, 150, and 200 mg of probiotics per kg of feed.

a-d Means with different letters in the same column have a significant difference at the 5% level.

به‌طور مشابه، پروبیوتیک‌های حاوی *Bacillus amyloliquefaciens TOA5001* ریخت‌شناسی روده، جمعیت میکروبی، فعالیت اکسیداتیو و کیفیت مایع منی را در خروس‌های مادر گوشتی بهبود داد (Inatomi and Otomaru, 2018). کاهش باروری در گله‌های مرغ مادر، یکی از اصلی‌ترین دغدغه‌ها به‌دلیل کاهش سود اقتصادی است. اگرچه کاهش باروری به هر دو جنس (خروس و خروس مادر) نسبت داده می‌شود، امّا در تحقیقات پیشین بیشترین اثرات را مربوط به خروس‌های مادر گزارش کرده‌اند و نشان داده‌اند که با حذف خروس‌های مسن از گله و افزودن خروس‌های جوان، باروری گله افزایش یافته است (Sabzian-Melei *et al.*, 2022).

اثر سطوح مختلف پروبیوتیک بر سطح گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در پلاسمای اسپرم خروس‌های مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی طی ماه اول و دوم در جدول ۴ گزارش شده است. نتایج نشان داد که در ماه اول و دوم آزمایش، سطح گلوتاتیون پراکسیداز اسپرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵)، امّا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ماه اول در خروس‌های دریافت‌کننده ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در ماه دوم ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). مطابق با نتایج این آزمایش گزارش شد که استفاده از مخمر در جیره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم شد (Aluwong *et al.*, 2013). به‌طور مشابه، یک پروبیوتیک *Enterococcus faecium*، سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی کم را تحریک کرد و نشانگرهای اکسیداسیون را در خون کاهش داد (Ognik *et al.*, 2017). همچنین پروبیوتیک‌های *Lactobacillus fermentum* و *Enterococcus faecium* به‌طور قابل توجهی وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل را در جوجه-های گوشتی افزایش داد (Capcarová *et al.*, 2011). علاوه‌براین استفاده از ترکیب پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* غلظت آنتی‌اکسیدانی را در جوجه‌های گوشتی بهبود بخشید (Ebeid *et al.*, 2021). برخلاف نتایج این آزمایش، گزارش شده است که افزودن پروبیوتیک به جیره خروس‌های مادر گوشتی، به‌طور معنی‌داری باعث افزایش سطح گلوتاتیون پراکسیداز در اسپرم شد (Inatomi and Otomaru, 2018).

جدول ٤- اثر سطوح مختلف پروبیوتیک بر سطح گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسمای اسپرم در خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در ماه اول و دوم آزمایش (سن ۶۵ هفته)

Table 4- Effect of different probiotic levels on glutathione peroxidase level and total antioxidant capacity of sperm plasma in Ross 308 broiler hens in the first and second months of the experiment (age 65 weeks)

	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل Total antioxidant capacity (U/ml)		گلوتاتیون پراکسیداز Glutathione peroxidase (U/ml)	
تیمارهای آزمایشی* Experimental treatments*	ماه اول First month	ماه دوم Second month	ماه اول First month	ماه دوم Second month
شاهد Control	3.92^{b}	3.89^{b}	31.44	30.46
50	4.08^{b}	4.17^{a}	31.33	31.33
100	4.04^{b}	4.07^{a}	31.60	31.51
150	4.28^{a}	4.23^{a}	23.07	32.23
200	4.30^{a}	4.18^{a}	31.59	32.01
خطای استاندارد SEM	0.064	0.948	0.948	1.068
سطح احتمال معنی‌داری P value	0.0005	0.0362	0.0699	0.7968

* تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک در کیلوگرم خوراک

a-b میانگین‌هایی با حروف متفاوت در یک ستون دارای اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد هستند.

* Experimental treatments include control treatment, 50, 100, 150 and 200 mg of probiotics per kg of feed.

a-d Means with different letters in the same column have a significant difference at the 5% level.

اثر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک بر ریخت‌شناسی ژژنوم و ایلئوم و اسیدیته (pH) آن‌ها در خروس‌های مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در انتهای دوره (سن ۶۵ هفتگی) در جدول ۵ گزارش شده است. طول پرز در گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک به‌طور معنی-داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) بیشترین طول پرز ژژنوم در گروه دریافت‌کننده ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک و کمترین مربوط

به گروه شاهد بود که به‌ترتیب ۱۲۳۱ و ۱۱۵۶ میکرومتر بود. طول پرز به عمق کریپت در ژژنوم تحت تأثیر مصرف پروبیوتیک قرار گرفت که بیشترین نسبت طول پرز به عمق کریپت مربوط به گروه دریافت‌کننده ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک و کمترین نسبت در گروه شاهد به‌دست آمد و اختلاف بین آن‌ها نیز معنی‌داری بود (P<۰/۰۵). مطابق با نتایج این آزمایش گزارش شد که استفاده از مکمل پروبیوتیک در جیره جوجه‌های گوشتی باعث بهبود ریخت شناسی روده (افزایش ارتفاع پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت) شد (Abd El-Hack *et al*., 2020). بیشترین اسیدیته (pH) در ژژنوم مربوط به گروه‌های شاهد و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک و کمترین مقدار مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک بود. مصرف پروبیوتیک به‌طور معنی داری باعث افزایش طول پرز در ایلئوم شد (P<۰/۰۵). خروس‌های دریافت‌کننده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری طول پرز بیشتری از گروه‌های شاهد و دریافت‌کننده ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک داشتند. عمق کریپت در ایلئوم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. نسبت طول پرز به عمق کریپت در ایلئوم در گروه‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. با توجه به نتایج این آزمایش، در بسیاری از مطالعات گزارش شده است که طول پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت در مرغ‌های گوشتی تغذیه‌شده با پروبیوتیک افزایش یافته است (Jayaraman *et al*., 2013; Lei *et al*., 2014; Shamoto and Yamauchi, 2000). اسیدیته محتویات ایلئوم در گروه‌های دریافت‌کننده ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. ساختار و یکپارچگی اپیتلیوم روده از جمله عوامل مهمی هستند که با سلامت روده و ظرفیت گوارش در ارتباط هستند. به‌طور کلی، طول پرز به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت ارزیابی عملکرد روده شناخته می‌شود.

جدول ۵- اثر سطوح مختلف پروبیوتیک بر ریخت‌شناسی روده و اسیدیته (pH) ژژنوم و ایلئوم در خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی

Table 5- The effect of different levels of probiotics on intestinal morphology and jejunum and ileum acidity in Ross 308 broilers at the age of 65 weeks

		تیمارهای آزمایشی* Experimental treatments*						
	متغیر Item	شاهد Control	50	100	150	200	خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی‌داری P value
ژژنوم Jejunum	طول پرز (میکرومتر) Villus height (μm)	1156^{d}	1183^{c}	1198^{bc}	1231^{a}	1209^{b}	7.467	0.0001
	عمق کریپت (میکرومتر) Crypt depth (μm)	297.8	301.6	300.9	296.9	299.2	2.229	0.5631
	طول پرز به عمق کریپت Villus height to crypt depth ratio	3.88^{c}	3.92^{bc}	3.98^{bc}	4.15^{a}	4.04^{ab}	0.043	0.0005
	pH	6.59^{a}	6.53^{a}	6.50^{bc}	6.48^{bc}	6.46^{c}	0.016	0.0001
ایلئوم Ilium	طول پرز (میکرومتر) Villus height (μm)	488.7^{d}	500.3^{c}	508.6^{b}	512.4^{ab}	518.9^{a}	2.675	0.0001
	عمق کریپت (میکرومتر) Crypt depth (μm)	150.1	149.9	150.7	152.7	299.2	1.289	0.5689
	طول پرز به عمق کریپت Villus height to crypt depth ratio	3.26^{b}	3.34^{ab}	3.38^{ab}	3.36^{ab}	4.04^{a}	0.037	0.0265
	pH	6.83^{a}	6.80^{ab}	6.77^{b}	6.76^{b}	6.46^{bc}	0.014	0.0031

* تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک در کیلوگرم خوراک

a-b میانگین‌ها با حروف متفاوت در یک ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد هستند.

*Experimental treatments include control treatment, 50, 100, 150 and 200 mg of probiotics per kg of feed.

a-d Means with different letters in the same column have a significant difference at the 5% level.

طول پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت یکی از عوامل نشان دهنده بهبود قابلیت هضم مواد مغذی و ظرفیت جذب روده کوچک محسوب می‌شود (Inatomi and Otomaru, 2018). مطالعات بسیاری، افزایش طول پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت را در مرغهای گوشتی تغذیه‌شده با پروبیوتیک گزارش کرده‌اند (Jayaraman *et al*., 2013; Lei *et al*., 2014; Shamoto *et al*., 2000).

اثر سطوح مختلف پروبیوتیک تجاری بر جمعیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و *ای‌کلای* در ژژنوم و ایلئوم خروس‌های مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در جدول ۶ گزارش شده است. نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک اثر معنی‌داری بر تعداد باکتری های *لاکتوباسیلوس* و *ای‌کلای* در ژژنوم و ایلئوم داشت (P<۰/۰۵). با افزودن پروبیوتیک به جیره، تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلی* در ژژنوم و ایلئوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که بیشترین تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس* در ژژنوم مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک بود و کمترین آن مربوط به گروه شاهد بود. مطابق با نتایج این آزمایش گزارش شده است که پروبیوتیک‌ها بر جمعیت میکروبی روده تأثیر مثبت می‌گذارند و باکتری‌های مفید مانند *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* را افزایش می‌دهند (Kazemi *et al*., 2019; Song *et al*., 2014). تعداد باکتری‌های *ای‌کلای* ژژنوم در گروه‌های دریافت‌کننده ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود و همچنین کمترین تعداد این باکتری مربوط به گروه دریافت‌کننده ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک بود که اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشتند (P<۰/۰۵). مشابه با این نتایج گزارش شده است که پروبیوتیک‌ها بر جمعیت میکروبی روده تأثیر مثبت می‌گذارند به‌طوری‌که باکتری‌های مفید را افزایش و در عین حال باکتری‌های مضر مانند *کلیفرم‌ها* و *کلستریدیوم* را کاهش می‌دهند (Kazemi *et al*., 2019; Song *et al*., 2014). همچنین پروبیوتیک‌ها با استفاده از حذف عوامل بیماری‌زا در روده به جلوگیری از چسبیدن آن‌ها به اپیتلیوم روده کمک می‌کنند و در نتیجه مانع از ایجاد پاسخ‌های التهابی ناشی از عوامل بیماری‌زا و سموم می‌شوند، بنابراین سرکوب باکتری‌های بیماری‌زا به بهبود طول پرز منجر می‌شود (Fan *et al*., 1997). اثرات بازدارندگی پروبیوتیک‌ها بر رشد عوامل بیماری‌زا در جوجه‌های گوشتی در مطالعات زیادی گزارش شده است (Taheri *et al*., 2010). بسیاری از مطالعات، این اثر را به‌دلیل رقابت باکتری‌های پروبیوتیکی با پاتوژن‌ها برای چسبیدن به دیواره روده گزارش کرده اند، بنابراین افزایش باکتری‌های پروبیوتیکی در روده، شرایط را برای رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا سخت می‌کند. از طرفی دیگر، باکتری‌های پروبیوتیکی از طریق تولید اسیدلاکتیک، ترکیبات ضدباکتریایی، و محیط را برای باکتری‌های بیماری‌زا نامناسب و مانع رشد و تکثیر آن‌ها می‌شوند (Klaenhammer, 1993).

جدول ٦- اثر سطوح مختلف پروبیوتیک بر میکروفلور ژژنوم و ایلئوم در خروس‌های مادر گوشتی راس ۳۰۸ در سن ۶۵ هفتگی

Table 6- The effect of different levels of probiotics on jejunum and ileum microflora in Ross 308 broiler hens

تیمارهای آزمایشی* Experimental treatments*	ژژنوم Jejunum		ایلئوم Ilium	
	لاکتوباسیلوس *Lactobacillus*	*ای-کلای* *E-Coli*	*لاکتوباسیلوس* *Lactobacillus*	*ای-کلای* *E-Coli*
	$\log_{10}$ (CFU/g)			
شاهد Control	7.52[c]	6.81[a]	7.40[c]	6.55[a]
50	7.59[b]	6.72[b]	7.48[b]	6.51[b]
100	7.65[b]	6.64[c]	7.58[a]	6.49[b]
150	7.67[a]	6.57[d]	7.71[a]	6.49[b]
200	7.66[a]	6.54[d]	7.64[a]	6.51[b]
خطای استاندارد SEM	0.020	0.014	0.022	0.014
سطح احتمال معنی‌داری P value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0122

* تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک در کیلوگرم خوراک

[a-b] میانگین‌هایی با حروف متفاوت در یک ستون دارای اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد هستند.

* Experimental treatments include control treatment, 50, 100, 150 and 200 mg of probiotics per kg of feed.

[a-d] Means with different letters in the same column have a significant difference at the 5% level.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌ها در تغذیه طیور با استفاده از استقرار در دستگاه گوارش و ممانعت از چسبیدن پاتوژن‌ها به پرزهای روده، ایجاد شرایط اسیدی و تولید باکتری‌کش باعث افزایش قابلیت هضم مواد مغذی می‌گردد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد اسپرم‌های زنده در خروس‌های مادر گوشتی تغذیه‌شده با ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. به‌طور کلی، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از صفات اسپرم، ریخت‌شناسی روده، جمعیت میکروبی‌روده و وضعیت آنتی‌اکسیدانی خروس مادر در این آزمایش و همچنین بحث قیمت تمام‌شده جیره، می‌توان ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک را مناسب‌ترین سطح مورد استفاده گزارش نمود.

References

1. Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Qattan, S. Y., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., & Alagawany, M. (2020). Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*(6), 1835-1850. https://doi.org/10.1111/jpn.13454
2. Ahmad, I. (2006). Effect of probiotics on broilers performance. *International Journal of Poultry Science*, *5*(6), 593-597. ISSN 1682-8356. https://doi.org/10.3923/ijps.2006.593.597
3. Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z. A., Zhandi, M., Deldar, H., & Poureslami, R. (2014). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). *Poultry Science*, *93*(5), 1236-1244. https://doi.org/10.3382/ps.2013-03617
4. Alhefny, S. A., Ismail, Z., & Hassan, H. (2022). Influence of feed form and probiotic levels on growth performance, carcass traits, some blood parameters and nutrients digestibility of broiler chicks. *SVU-International Journal of Agricultural Sciences*, *4*(4), 58-66. https://doi.org/10.21608/svuijas.2022.180592.1251
5. Aluwong, T., Kawu, M., Raji, M., Dzenda, T., Govwang, F., Sinkalu, V., & Ayo, J. (2013). Effect of yeast probiotic on growth, antioxidant enzyme activities and malondialdehyde concentration of broiler chickens. *Antioxidants*, *2*(4), 326-339. https://doi.org/10.3390/antiox2040326
6. Amini, M. R., Kohram, H., Zare Shahaneh, A ,.Zhandi, M., Sharideh, H., & Nabi, M. M. (2015). The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell and Tissue Banking*, *16*, 587-592. https://doi.org/10.1007/s10561-015-9506-9
7. Andraszek, K., Banaszewska, D., & Biesiada-Drzazga, B. (2018). The use of two staining methods for identification of spermatozoon structure in roosters. *Poultry Science*, *97*(7), 2575-2581 . https://doi.org/10.3382/ps/pey056
8. Angelakis, E. (2017). Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*, *106*, 162-170. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002
9. Assersohn, K., Brekke, P., & Hemmings, N. (2021). Physiological factors influencing female fertility in birds. *Royal Society Open Science*, *8*(7), 202274. https://doi.org/10.1098/rsos.202274
10. Aziz, H., & Al-Hawezy, D. (2022). Effects of probiotic, prebiotic and symbiotic on broiler breeder performance, egg production at different stock density. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, *53*(3), 636-644 . https://doi.org/10.36103/ijas.v53i3.1573
11. Bakst, M. (1980). Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *Reproduction*, *60*(1), 121-127. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600121
12. Blajman, J. E., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Berisvil, A. P., Fusari, M., Soto, L., &Frizzo, L. (2015). Probiotics in broilers' rearing: A strategy for intensive production models. *Revista Argentina de Microbiologia*, *47*(4), 360-367. https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002
13. Capcarová, M., KolesÃ, A., PetruÅ, P., KalafovÃ, A., & Gabriel, P. (2011). Effect of probiotic supplementation on selected indices of energy profile and antioxidant status of chickens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *1*(2), 225-235.
14. Ebeid, T., Al-Homidan, I., Fathi, M., Al-Jamaan, R., Mostafa, M., Abou-Emera, O., Abd El-Raz, M., & Alkhalaf, A. (2021). Impact of probiotics and/or organic acids supplementation on growth performance, microbiota, antioxidative status, and immune response of broilers. *Italian Journal of Animal Science*, *20*(1), 2263-2273. https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.2012092
15. Fan, Y., Croom, J., Christensen, V., Black, B., Bird, A., Daniel, L., & Eisen, E. (1997). Jejunal glucose uptake and oxygen consumption in turkey poults selected for rapid growth. *Poultry Science*, *76*(12), 1738-1745.

https://doi.org/10.1093/ps/76.12.1738
16. Fesseha, H. (2019). Probiotics and its potential role in poultry production: A review. *Veterinary Medicine-Open Journal*, *4*(2), 69-76 . https://doi.org/10.17140/vmoj-4-138
17. Fouad, A. M., El-Senousey, H. K., Ruan, D., Xia, W., Chen, W., Wang, S., & Zheng, C. (2020). Nutritional modulation of fertility in male poultry. *Poultry Science*, *99*(11), 5637-5646. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.083
18. Haines, M. D., Parker, H. M., McDaniel, C. D., & Kiess, A. S. (2013). Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility in vitro. *Poultry Science*, *92*(8), 2174-2181. https://doi.org/10.3382/ps.2013-03109
19. Hassan, W., Mustafa, M., & Isa, R. (2023). Effect of herbal extracts as alternatives to antibiotics in the first week of age on broiler performance, serum biochemistry, and intestinal morphology under commercial farm conditions. *South African Journal of Animal Science*, *53*(3), 455-465 https://doi.org/10.4314/sajas.v53i3.14
20. Inatomi, T., & Otomaru, K. (2018). Effect of dietary probiotics on the semen traits and antioxidative activity of male broiler breeders. *Scientific Reports*, *8*(1), 5874. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24345-8
21. Jadhav, K., Sharma, K., Katoch, S., Sharma, V., & Mane, B. (2015). Probiotics in broiler poultry feeds: A review. *Journal of Animal Nutration Physiology*, *1*, 4-16 .
22. Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., & Chirakkal, H. (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, *92*(2), 370-374 .https://doi.org/10.3382/ps.2012-02528
23. Jeacocke, R. E. (1977). Continuous measurements of the pH of beef muscle in intact beef carcases. *International Journal of Food Science and Technology*, *12*(4), 375-386. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb00120.x
24. Kazemi, S. A., Ahmadi, H., & Karimi Torshizi, M. A. (2019). Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(5), 1399-1407. https://doi.org/10.1111/jpn.13124
25. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *12*(1-3), 39-85 .
26. Khan, R. U., Rahman, Z. U., Javed, I., & Muhammad, F. (2012). Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Animal Reproduction Science*, *135*(1-4), 85-90. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.09.005
27. Khan, R. U., Javed, I., & Muhammad, F. (2013). Supplementation of dietary vitamins, protein and probiotics on semen traits and immunohistochemical study of pituitary hormones in zinc-induced molted broiler breeders. *Acta Histochemica*, *115*(7), 698-704. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.02.006
28. Krysiak, K., Konkol, D., & Korczyński, M. (2021). Overview of the use of probiotics in poultry production. *Animals*, *11*(6), 1620. https://doi.org/10.3390/ani11061620
29. Lei, K., Li, Y., Yu, D., Rajput, I., & Li, W. (2013). Influence of dietary inclusion of *Bacillus licheniformis* on laying performance, egg quality, antioxidant enzyme activities, and intestinal barrier function of laying hens. *Poultry Science*, *92*(9), 2389-2395 .https://doi.org/10.3382/ps.2012-02686
30. Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., & Zhang, H. (2015) .(Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*(2), 239. https://doi.org/10.5713/ajas.14.0330
31. Lei, X., Ru, Y., & Zhang, H. (2014). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbials and antibiotic on performance, nutrient digestibility, cecal microflora, and intestinal morphology in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, *23*(3), 486-493 .https://doi.org/10.3382/japr.2014-00965
32. Mazanko, M. S., Gorlov, I. F., Prazdnova, E. V., Makarenko, M. S., Usatov, A. V., Bren, A. B., &Mosolova, N. I. (2018). *Bacillus* probiotic supplementations improve laying performance, egg quality, hatching of laying hens, and sperm quality of roosters. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*, 367-373. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9369-4
33. Mountzouris, K., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., & Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, *86*(2), 309-317. https://doi.org/10.1093/ps/86.2.309
34. Musa, A., Anwar, H., & Sadeghi, A. (2021). Age-related changes in reproductive traits of poultry: Influence of dietary supplementation. *Journal of Animal Science*, *10*(3), 229-238.
35. Ogbuewu, I. P., Mabelebele, M., Sebola, N. A., & Mbajiorgu, C. (2022). *Bacillus* probiotics as alternatives to in-feed antibiotics and its influence on growth, serum chemistry, antioxidant status, intestinal histomorphology, and lesion scores in disease-challenged broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 876725.

https://doi.org/10.3389/fvets.2022.876725

36. Ognik, K., Krauze, M., Cholewińska, E., & Abramowicz, K. (2017). The effect of a probiotic containing DSM 7134 on redox and biochemical parameters in chicken blood. *Annals of Animal Science, 17*(4), 1075-1088. https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0097
37. Poorghasemi, M., Chamani, M., Mirhosseini, S. Z., Sadeghi, A. A., & Seidavi, A. (2018). Effect of probiotic and different sources of fat on performance, carcass characteristics, intestinal morphology and ghrelin gene expression on broiler chickens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24*(2). https://doi.org/10.9775/kvfd.2017.18433
38. Prentza, Z., Castellone, F., Legnardi, M., Antlinger, B., Segura-Wang, M., Kefalas, G., Fortomaris, P., Argyriadou, A., Papaioannou, N., Stylianaki, I., Franzo, G., Cecchinato, M., Papatsiros, V., & Koutoulis, K., (2022). Effects of a multi-genus synbiotic (PoultryStar® sol) on gut health and performance of broiler breeders. *Journal of World's Poultry Research*, *12*(4), 212-229. https://doi.org/10.36380/jwpr.2022.24
39. Sabzian-Melei, R., Zare-Shahneh, A., Zhandi, M., Yousefi, A. R., & Rafieian-Naeini, H. R. (2022). Effects of dietary supplementation of different sources and levels of selenium on the semen quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. *Poultry Science*, *101*(10), 101908. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101908
40. SAS. (2003). User's Guide: Statistics, Version 9.1: SAS Institute Inc., Cary, NC.
41. Shakouri, N., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Bucak, M. N. (2021). Antioxidant effects of supplementation of 3, 4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, *56*(7), 1004-1014. https://doi.org/10.1111/rda.13944
42. Shamoto, K., & Yamauchi, K. (2000). Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poultry Science*, *79*(5), 718-723. https://doi.org/10.1093/ps/79.5.718
43. Smirnov, A., Perez, R., Amit-Romach, E., Sklan, D., & Uni, Z. (2005). Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *The Journal of Nutrition*, *135*(2), 187-192. https://doi.org/10.1093/jn/135.2.187
44. Smolovskaya, O., Pleshkov, V., Zubova, T., & Bormina, L. (2023). Probiotics in industrial poultry farming. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, *18*(1), 1-8. https://doi.org/10.3844/ajavsp.2023.1.8
45. Song, J., Xiao, K., Ke, Y., Jiao, L., Hu, C., Diao, Q., Shi, B.,& Zou, X. (2014). Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science*, *93*(3), 581-588. https://doi.org/10.3382/ps.2013-03455
46. Taheri, H. R., Moravej, H., Malakzadegan, A., Tabandeh, F., Zaghari, M., Shivazad, M., & Adibmoradi, M. (2010). Efficacy of *Pediococcus acidlactici*-based probiotic on intestinal Coliforms and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*, *9*(44), 7564-7567. https://doi.org/10.5897/AJB10.535
47. Tapeh, R. S., Zhandi, M., Zaghari, M., & Akhlaghi, A. (2017). Effects of guanidinoacetic acid diet supplementation on semen quality and fertility of broiler breeder roosters. *Theriogenology*, *89*, 178-182. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.012
48. Touchette, K., Carroll, J., Allee, G., Matteri, R., Dyer, C., Beausang, L., & Zannelli ,M. (2002). Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *Journal of Animal Science*, *80*(2), 494-501. https://doi.org/10.2527/2002.802494x
49. Zamiri, M., Khalili, B., Jafaroghli, M., & Farshad, A. (2010). Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. *Small Ruminant Research*, *94*(1-3), 132-136. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.013